

## P C T

## 国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)  
〔P C T 1 8 条、P C T 規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 P2-00S02014	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(P C T / I S A / 2 2 0) 及び下記 5 を参照すること。		
国際出願番号 P C T / J P 0 0 / 0 1 4 1 5	国際出願日 (日.月.年) 0 8 . 0 3 . 0 0	優先日 (日.月.年) 0 8 . 0 3 . 9 9	
出願人 (氏名又は名称) 昭和産業株式会社			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (P C T 1 8 条) の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第47条 (P C T 規則38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N15/75, C12N1/21, C12P21/00, C12P21/02

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C12N15/75, C12N1/21, C12P21/00, C12P21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DBJ

BIOSIS(DIALOG)

WPI(DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	LEHTOVAARA, P., et al., "In vivo transcription initiation and termination sites ... from Bacillus amyloiruefaciens ...", Gene (1984) Vol. 30, No. 1/3, p. 11-16	1-16
A	HORINOUCI, S., et al., "Construction and characterization of multicopy expression-vectors ...", Mol. Gen. Genet. (1987) Vol. 210, No. 3, p. 468-475	1-16

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.06.00

国際調査報告の発送日

20.06.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明



4B

9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	EP 681027 A2 (ENIRICERCHE S. P. A.) 8 November 1995 &JP 7-289271 A, &US 5721137 A, &IT 1274168 B	1 - 1 6
A	JP 4-278091 A (ヒゲタ醤油株式会社) 2 October 1992 ファミリーなし	1 - 1 6



## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
 United States Patent and Trademark  
 Office  
 Box PCT  
 Washington, D.C.20231  
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

<b>Date of mailing (day/month/year)</b> 20 October 2000 (20.10.00)	
<b>International application No.</b> PCT/JP00/01415	<b>Applicant's or agent's file reference</b> P2-00S02014
<b>International filing date (day/month/year)</b> 08 March 2000 (08.03.00)	<b>Priority date (day/month/year)</b> 08 March 1999 (08.03.99)
<b>Applicant</b> INOUE, Yasushi et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:  
 28 August 2000 (28.08.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

<b>The International Bureau of WIPO</b> 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	<b>Authorized officer</b>  Henrik Nyberg  Telephone No.: (41-22) 338.83.38
--	--





6TD  
Translation  
09/936/45

1608  
PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

1652  
RECEIVED

FEB 14 2002

TECH CENTER 1600/2900

Applicant's or agent's file reference P2-00S02014	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/01415	International filing date (day/month/year) 08 March 2000 (08.03.00)	Priority date (day/month/year) 08 March 1999 (08.03.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/75, 1/21, C12P 21/00, 21/02		
Applicant SHOWA SANGYO CO., LTD.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.  <input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).  These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items:  I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 28 August 2000 (28.08.00)	Date of completion of this report 15 May 2001 (15.05.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

RECEIVED

APR 4 1968

TECH CENTER 1800000

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/01415

## I. Basis of the report

### 1. With regard to the elements of the international application:\*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the claims:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

### 2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

### 3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

### 4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

### 5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 00/01415

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

### 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-16	YES
	Claims		NO

### 2. Citations and explanations

Document 1: Gene (1984), Vol. 30, No. 1/3, pp. 11-16

Document 2: Mol. Gen. Genet. (1987), Vol. 210, No. 3, pp. 468-475

Document 3: EP, 681027, A2 (Enricerche S.P.A.), 8 November 1995

Document 4: JP, 4-278091, A (Higeta Shoyu Co., Ltd.), 2 October 1992

The inventions disclosed in Claims 1-16 involve an inventive step relative to Documents 1-4 cited in the international search report. Documents 1-4 do not disclose the insertion of a sequence having a restriction enzyme cleavage site sequence into the vicinity of the 3' terminus of an  $\alpha$ -amylase promoter from a microorganism of genus Bacillus, between the terminus and the initiator codon for the protein, and due to this feature the inventions in the present application have the advantageous effect of raising promoter activity.



特 許 協 力 条 約

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)  
(PCT36条及びPCT規則70)


REC'D 28 MAY 2001

WIPO PCT

出願人又は代理人 の書類記号 P2-00S02014	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/01415	国際出願日 (日.月.年) 08.03.00	優先日 (日.月.年) 08.03.99
国際特許分類 (IPC) Int. Cl <sup>7</sup> C12N15/75, C12N1/21, C12P21/00, C12P21/02		
出願人 (氏名又は名称) 昭和産業株式会社		

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。  
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で ページである。

- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
  - ☒ 国際予備審査報告の基礎
  - ☐ 優先権
  - ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
  - ☐ 発明の単一性の欠如
  - ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
  - ☐ ある種の引用文献
  - ☐ 国際出願の不備
  - ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 28.08.00	国際予備審査報告を作成した日 15.05.01	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 小暮 道明 印 	4B 9358
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

様式PCT/IPEA/409 (表紙) (1998年7月)





## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に  
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。  
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 出願時に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 出願時に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 図面 第 \_\_\_\_\_ ページ/図、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 出願時に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの  
 明細書の配列表の部分 第 \_\_\_\_\_ ページ、 \_\_\_\_\_ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語  
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語  
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表  
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表  
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった  
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ  
☐ 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項  
☐ 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)



## V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	1-16	有
	請求の範囲		無
進歩性(IS)	請求の範囲	1-16	有
	請求の範囲		無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-16	有
	請求の範囲		無

## 2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

文献1: Gene (1984) Vol. 30, No. 1/3, p. 11-16  
文献2: Mol. Gen. Genet (1987) Vol. 210, No. 3, p. 468-475  
文献3: EP, 681027, A2 (ENIRICERCHE S.P.A) 8 November 1995  
文献4: JP, 4-278091, A (ヒゲタ醤油株式会社) 2 October 1992

請求の範囲1-16に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献1-4に対して進歩性を有する。文献1-4には、バチルス属に属する微生物に由来する $\alpha$ -アミラーゼのプロモーターの3'末端近傍とタンパク質の開始コドンとの間に制限酵素切断部位配列を有する配列を導入することが記載されておらず、本願発明はそれによりプロモーター活性が向上するという有利な効果を発揮する。





PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類7 C12N 15/75, 1/21, C12P 21/00, 21/02</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/53778</p> <p>(43) 国際公開日 2000年9月14日(14.09.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP00/01415</p> <p>(22) 国際出願日 2000年3月8日(08.03.00)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平11/60904 1999年3月8日(08.03.99) JP 特願平11/286034 1999年10月6日(06.10.99) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 昭和産業株式会社(SHOWA SANGYO CO., LTD.)(JP/JP) 〒101-8521 東京都千代田区内神田2丁目2番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 井上 靖(INOUE, Yasushi)(JP/JP) 伏見直也(FUSHIMI, Naoya)(JP/JP) 水淵裕之(MIZUBUCHI, Hiroyuki)(JP/JP) 山本良重(YAMAMOTO, Yoshie)(JP/JP) 大島良恵(OHSHIMA, Yoshie)(JP/JP) 安武 望(YASUTAKE, Nozomu)(JP/JP) 三吉新介(MIYOSHI, Shinsuke)(JP/JP) 〒305-0003 茨城県つくば市桜1丁目16番 昭和産業株式会社 総合研究所 バイオ研究センター内 Ibaraki, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 弁理士 南條博道(NANJO, Hiromichi) 〒530-0047 大阪府大阪市北区西天満3丁目2番9号 翁ビル5階 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, CA, CN, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: <b>PROMOTERS</b></p> <p>(54)発明の名称 プロモーター</p> <p>(57) Abstract Promoters having higher activity than <math>\alpha</math>-amylase promoter of a microorganism belonging to the genus <i>Bacillus</i> which are obtained by transferring one or more restriction enzyme cleavage site sequences into the vicinity of the 3'-terminus of the <math>\alpha</math>-amylase promoter originating in a microorganism belonging to the genus <i>Bacillus</i>.</p>		

(57)要約

バチルス属に属する微生物に由来する $\alpha$ -アミラーゼのプロモーターの3'末端近傍に制限酵素切断部位配列を1又は2以上導入することにより、バチルス属の微生物の $\alpha$ -アミラーゼプロモーターよりも活性が高いプロモーターが提供される。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LJ	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサウ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CC	中東アフリカ	HU	ハンガリー	MR	モリタニア	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MX	メキシコ	US	米国
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MZ	モザンビーク	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IN	インド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IS	アイスランド	NL	オランダ	YU	ユーゴスラヴィア
CU	キューバ	IT	イタリア	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	JP	日本	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KE	ケニア	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
		KR	韓国				

## 明 細 書

## プロモーター

## 5 技術分野

本発明は、プロモーターに関する。さらに詳しくは、プロモーターの下流の3'末端近傍に制限酵素切断部位配列を有し、かつ、プロモーター活性が向上した、新規なプロモーターに関する。

## 10 背景技術

微生物による物質生産の手段として、目的の蛋白質をコードする遺伝子をベクターに組み込み、得られた組換えベクターを細胞に導入して、この遺伝子を発現させ、目的の蛋白質を宿主微生物中に生産させることが広く行われている。この遺伝子の発現に関する領域の一つにプロモーターがある。

15 プロモーターは、RNAポリメラーゼが認識し結合する領域である-35および-10領域を含む領域と、RNAポリメラーゼにより合成されたmRNAとリボソームとの結合を指定する領域とを含んでいる。プロモーター領域の塩基配列は、発現効率に関して、極めて重要であるのみならず、その塩基配列間の距離すなわち塩基数も重要である（Mol. gen. Genet. 186 339-(1  
20 982)）。

プロモーターの配列及び塩基配列に関する研究は、まず、大腸菌のプロモーターで行われ、大量発現のためのプロモーターも作成されており、大腸菌を宿主とする物質生産が行われている。

しかし、大腸菌はパイロジェンを生産するため、蛋白生産において、精製  
25 に多大なコストが必要となる。従って、医薬品、食品等の分野には適していないため、他の微生物等の宿主細胞が望まれている。その中でも、バチルス

属の微生物は、醗酵生産に用いられてきた経験があること、分泌性が高いこと、及び、病原性がなく発熱物質を生産しないこと等の理由から、宿主細胞として有望視されている。

5       バチルス属の微生物を宿主とする蛋白質の生産に関する報告は多数あるが、ほとんどの場合、分泌を目的として、分泌シグナル配列に目的の蛋白質をコードする遺伝子をインフレーションで接続する点に主眼が置かれており（例えば、特開昭59-205996号公報、特開昭62-215393号公報、特開平3-206889号公報、特公平6-69377号公報、特開平7-155183号公報等）、プロモーター活性を高くする試みはほとんど行われていない。

10       バチルス属のプロモーターの改良に関して、特表平6-500689号公報にはバチルス・サチルスと $\alpha$ アミラーゼのハイブリッドプロモーターが記載され、特表平7-504085号公報には、バチルス・リヘニフォルミスの $\alpha$ アミラーゼ遺伝子の553番目と588番目から595番目までに9個の変異を有するプロモーターが、天然の配列に比べて活性が高いことが記載されているが、まだ十分に活性が高いとはいえない。

15       このように、バチルス属のプロモーターの改良に関する研究成果がほとんど報告されていないのは、研究が成されていないのではなく、ほとんど成果が上がらないからと考えられ、これが、バチルス属の微生物の組換え宿主としての利用を妨げている一つの原因とも考えられる。

20       従って、特に、医薬品あるいは食品の分野において、バチルス属の微生物のプロモーターの発現効率を高め、宿主としての利用価値を高めることが望まれているのが現状である。

25       従って、本発明は、バチルス属微生物の高活性のプロモーターを提供し、バチルス属の宿主としての利用を高めることを目的とする。



## 発明の開示

本発明者らは上記課題を解決すべく、バチルス・アミロリクファシエンス由来 $\alpha$ アミラーゼプロモーター領域の3'末端近傍に位置するDNA配列に変異を加えることによってプロモーター活性が向上することを見出して、本

5

すなわち、本発明は、バチルス属に属する微生物に由来する $\alpha$ -アミラーゼのプロモーターであって、該プロモーター配列の3'末端近傍とタンパク質の開始コドンとの間に1または2以上の制限酵素切断部位配列を有する配列が導入され、かつ、該プロモーターの活性が天然のプロモーターの活性よりも高い、プロモーターに関する。

10

好ましい実施態様においては、前記 $\alpha$ -アミラーゼのプロモーターが、バチルス・アミロリクファシエンスに由来する。

また、好ましい実施態様においては、前記制限酵素切断部位がB a m H Iである。

15

より好ましい実施態様においては、前記プロモーターが配列番号1に記載の配列を有する。

また、別の好ましい実施態様においては、前記制限酵素切断部位配列が、B a m H IとB a m H I以外の1又は2以上の制限酵素切断部位を含む配列であり、該B a m H I以外の制限酵素切断部位が該B a m H I切断部位よりも下流に存在する。

20

より好ましい実施態様においては、前記制限酵素切断部位配列が、B a m H IとE c o R Iとの制限酵素切断部位配列を有し、該B a m H IとE c o R I切断部位との間に1又は2以上の制限酵素切断部位配列を有してもよい。

さらに好ましい実施態様においては、前記プロモーターの配列が配列番号2の配列であり、前記制限酵素切断部位が5'末端側から順に、B a m H I、S m a I、K p n I、S a c IおよびE c o R Iの制限酵素切断部位である。

25

さらに、別の好ましい実施態様においては、前記制限酵素切断部位配列が、5'末端側からBamHI、NdeI、およびXhoIの順で制限酵素切断部位配列を有する。

本発明は、また、前記のプロモーターを有する発現カセットに関する。

5 さらに本発明は、この発現カセットの制限酵素切断部位にタンパク質をコードする遺伝子が組み込まれた発現ベクターに関する。

好ましい実施態様においては、前記タンパク質をコードする配列が菌体内酵素の配列である。

10 さらに好ましい実施態様においては、前記タンパク質をコードする配列がホスホリラーゼまたはイソメラーゼの配列である。

より好ましい実施態様においては、前記ホスホリラーゼがトレハロースホスホリラーゼ、またはマルトースホスホリラーゼである。

また、別の好ましい実施態様においては、前記イソメラーゼがマンノースイソメラーゼである。

15 本発明は、さらに、上記発現ベクターを有する組換え微生物並びにこの組換え微生物を培養する工程を含む、タンパク質の製造方法に関する。

#### 図面の簡単な説明

20 図1は、本発明のプロモーターの取得および発現カセットの作製を示す模式図である。

図2は、本発明の発現カセットpUB-PBE作成の模式図である。

図3は、本発明の発現ベクターpUB-PB-MP作製の模式図である。

図4は、本発明の発現ベクターpUB-PBE-MP作製の模式図である。

図5は、本発明の発現ベクターpUB-PB-TP作製の模式図である。

25 図6は、本発明の発現ベクターpUB-PBE-TP作製の模式図である。

図7は、比較例1の発現ベクターpUB-P-MP作製の模式図である。

図 8 は、比較例 2 の発現ベクター pUB-P-T P 作製の模式図である。

図 9 は、本発明の発現カセット pUB-PBN 作製の模式図である。

図 10 は、本発明の発現ベクター pUB-PBN-MI 作製の模式図である。

5 図 11 は、本発明の発現ベクター pUB-P-MI 作製の模式図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

##### (プロモーター)

本発明のプロモーターは、バチルス属に属する微生物に由来する  $\alpha$ -アミ  
10 ラーゼのプロモーターを改変したものである。バチルス属に属する微生物と  
しては、バチルス・アミロリクファシエンス、バチルス・サチルス、バチル  
ス・リヘニホルミス、バチルス・ポリミクサ、バチルス・ステアロサーモフ  
ィラス、バチルス・セルオプロテオリチクス、バチルス・コアギュランス、  
バチルス・スリンジエンシス、バチルス・メガテリウム、バチルス・セレウ  
15 ス、バチルス・ナット、バチルス・アシドカアルダリウス等が挙げられる。  
中でも、バチルス・アミロリクファシエンスに由来する  $\alpha$ -アミラーゼのプ  
ロモーターが発現効率の点から好ましい。

本発明の  $\alpha$ -アミラーゼのプロモーターは、3' 末端近傍とタンパク質の  
開始コドンとの間に 1 または 2 以上の制限酵素切断部位配列を有する配列が  
20 導入されている。ここで 3' 末端の近傍とは、3' 末端から数えて約 10 b  
p をいう。制限酵素切断部位の種類には、特に制限がなく、BamHI、S  
maI、KpnI、SacI、EcoRI、HindIII、PstI、NdeI、XhoI 等が挙げられる。1つの制限酵素部位の場合、BamHI が  
好ましい。複数の制限酵素切断部位を有する場合も、少なくとも一つの Ba  
25 mHI 部位を有し、その下流に他の制限酵素切断部位があることが好ましい。  
この場合、他の制限酵素部位としては、EcoRI が好ましく、BamHI

とEcoRIとの制限酵素切断部位の間に1又は2以上の制限酵素切断部位、例えば、SmaI、KpnI、SacIを有してもよい。もちろん、EcoRIより下流に、さらに別の制限酵素切断部位、例えば、HindIII、PstI等を有することができる。

- 5        また、BamHIとNdeIとXhoIとを5'側からこの順で有する制限酵素切断部位配列も好ましく用いられる。

本発明のプロモーターが後述の発現カセットあるいは発現ベクターに用いられる場合、複数の制限酵素部位は、マルチクローニングサイトとして用いられる。すなわち、外来遺伝子の組み込みが容易になるように、複数の制限  
10        酵素切断部位を設けることができる。マルチクローニングサイトに用いるベクターの制限酵素切断部位を考慮して決定すれば良い。

本発明のプロモーターの好ましい配列は、配列番号1に記載の配列である。この配列は、3'末端にBamHI切断部位配列を有している。2以上の制限酵素切断部位（すなわち、マルチクローニングサイト）を有する場合の好  
15        ましい配列は、配列番号2の配列である。この配列番号2の配列の3'末端側には、BamHI、SmaI、KpnI、SacIおよびEcoRIの制限酵素切断部位が、この順で配置されている。

本発明のプロモーターは、バチルス属の微生物に由来する $\alpha$ アミラーゼのプロモーター領域の3'末端近傍に制限酵素切断部位配列を導入することにより得られる。制限酵素切断部位配列の導入には、適切な遺伝子組換え方法  
20        が用いられる。例えば、制限酵素切断部位配列を有するプライマーを用いるPCRなどの方法が適用される。PCR法が、プロモーターの単離と制限酵素部位の導入の両方を同時にできるので、好ましい。PCRのプライマーは、例えば、Gene 15 43-(1981)に記載されたバチルス・アミロリクファシエン  
25        ス由来の $\alpha$ アミラーゼのプロモーター配列を基にして作製でき、3'側のプライマーの配列に制限酵素切断部位配列を導入すればよい。配列番号4、配

列番号5の配列が制限酵素切断部位配列を導入するためのプライマーの例である。

(発現カセット)

5       本発明において、発現カセットとは、発現を意図する目的遺伝子の組み込み部位を1又は2以上有し、その目的遺伝子が組み込まれたときに発現できるようなベクターまたはプラスミドをいう。本発明のプロモーター領域は、その3'末端に目的遺伝子の組み込み部位となる制限酵素切断部位を有しているので、適切なベクターまたはプラスミドの適切な部位に、本発明のプロモーターを導入することにより、発現カセットが構築される。

10       発現カセット作製に用いられるベクターとしては、宿主菌株中で自己複製が可能であり、且つ、プロモーター配列、目的蛋白質をコードする構造遺伝子を安定に保持できるものであれば、いかなるものでも使用できる。このベクターは、宿主への導入確認のために、選択マーカー（例えば、アンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン／ネオマイシン耐性遺伝子などの薬剤耐性遺伝子）を有することが好ましい。また、適切なターミネーター、エンハンサーなどの発現調節配列を連結されていてもよい。適切なターミネーターの例として、 $\alpha$ アミラーゼのターミネーター配列（Gene 15、43(1981)）が挙げられる。

20       発現カセットの作成に用いられるバチルス属のベクターとしては、枯草菌で複製可能なpUB110（Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 75, 1423-(1978)）、pC194、pT127（Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74, 1680-(1977)）またはこれらの誘導体などが挙げられる。

25       その他、発現カセットの作製に用いられるベクターの例としては、大腸菌及び枯草菌で複製可能なシャトルベクターpHY300PLK（Jpn. J. Genet., 60 235-(1985)）、更に大腸菌で複製可能なpBR322（Gene, 2, 9

5-(1977)) や pUC19 (Messing, Methods. Enzymol., 101, 20-(1983)) などが挙げられる。

特に、シャトルベクターは、遺伝子の増幅などの点で有用である。

## 5 (発現ベクター)

本発明においては、発現ベクターとは、上記発現カセットの制限酵素切断部位に目的蛋白質をコードする構造遺伝子が組み込まれたベクターまたはプラスミドをいう。組み込まれる遺伝子は、導入される宿主で発現されるものであれば、どのようなものでもよい。例えば、ホスホリラーゼ（トレハロースホスホリラーゼ、マルトースホスホリラーゼ、コージビオースホスホリラーゼ、セロビオースホスホリラーゼ、ラミナリビオースホスホリラーゼなど）の遺伝子が挙げられる。特に、バチルス属に由来する遺伝子として、例えば、バチルス・ステアロサーモフィラス SK-1 株（通産省工業技術院生命工学工業技術研究所、特許微生物寄託センター、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号へ寄託（原寄託日1994年9月29日）、FERM BP-5594）由来トレハロースホスホリラーゼ（以降、TPaseと略す）、バチルス・スピーシーズ RK-1 株（通産省工業技術院生命工学工業技術研究所、特許微生物寄託センター、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号へ寄託（原寄託日1995年7月12日）、FERM BP-5592）由来マルトースホスホリラーゼ（以降、MPaseと略す）が挙げられる。バチルス属以外の微生物の遺伝子としては、アグロバクテリウム・ラディオバクター（*Agrobacterium radiobacter*）M36（通産省工業技術院生命工学工業技術研究所、特許微生物寄託センター、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号へ寄託（寄託日1999年4月23日）、FERM P-1737）由来マンノースイソメラーゼ（以下、MIaseと略す）などの遺伝子が挙げられる。

連結される外来遺伝子はそれにコードされている遺伝子産物の取得を目的とすること限定されず、タンパク質を合成しない場合（例えば、アンチセンスRNAによる発現制御）もその目的に含まれる。

5      なお、目的蛋白質をコードする遺伝子は、分泌に関与する、いわゆるリーダー配列を含んでいてもよいし、含んでいなくてもよい。前者の場合、目的蛋白質は宿主細胞外に分泌され、後者の場合、宿主細胞内に蓄積される。

10      目的蛋白質をコードする構造遺伝子の発現カセットへの組み込みは、当業者が用いる適切な方法で行われる。本発明のプロモーターの制限酵素切断部位と、その導入すべき遺伝子の3'末端および5'末端の配列が一致すれば、その制限酵素切断部位に導入することができる。一致しない場合は、制限酵素切断部位の配列を、導入すべき遺伝子の配列と適合させるか、導入すべき遺伝子の末端の配列を変えればよい。配列を変える方法としては、PCR、部位特異的突然変異などの方法が挙げられる。以上の組換えDNA技術は、例えば、Molecular Cloning A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989) を参照して行うことができる。

（組換え微生物および目的蛋白質の製造方法）

20      得られた発現ベクターは、ついで、宿主微生物に導入される。宿主微生物としては、特に制限はないが、例えば、大腸菌の場合には、DH5 $\alpha$ 株、HB101株、C600株、JM101株等が挙げられる。また、バチルス属宿主の場合にはバチルス・サチルス BD170株、168株、ISW1214株などが挙げられる。プロモーターがバチルス属に属する微生物に由来することから、バチルス属の微生物がもっとも好ましい。

25      宿主微生物への発現ベクターの導入方法は問わない。例えば、形質転換、形質導入、細胞融合、エレクトロポレーションなどの方法が挙げられる。例えば、大腸菌宿主の場合、MandelとHigaの方法 (J. Mol. Biol., 53, 159- (197

0))、Hanahanの方法(J. Mol. Biol., 166, 557-(1983))等が使用できる。また、バチルス属の微生物の場合にはコンピテントセル法(Mol. Gen. Genet., 167, 251-(1979))やプロトプラスト法(Mol. Gen. Genet., 168, 111-(1978))等を持ちいることができる。

- 5 導入後、選択マーカーで組換え微生物を取得し、得られた組換え微生物を培養することにより、目的の蛋白質が培地中に分泌され、もしくは微生物細胞内に蓄積されるので、常法により、目的蛋白質を回収すれば良い。

なお、本発明のプロモーター活性と天然のプロモーター配列の活性との比較は、プロモーター下流に組み込んだ外来遺伝子の発現量を測定することにより、行われる。

#### (実施例)

次に実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

- 15 (実施例1：本発明のプロモーターの取得および発現カセットの作製)

図1に、本発明のプロモーターの取得および発現カセットの作製の模式図を示す。バチルス・アミロリクファシエンス I F O 15535を培養し、常法により染色体DNAを回収した。Gene, 15, 43-(1981)に記載の $\alpha$ アミラーゼプロモーター配列をもとに、配列表の配列番号3および配列番号4の  
20 配列を有する2種類のプライマーを合成し、PCR法により増幅した。なお、PCRは、耐熱性ポリメラーゼとして、AmpliTaqGold(パーキンエルマー社製)を用い、GeneAmp PCR System 9700(パーキンエルマー社製)を使用して、製造者の指針に従って、行った。

PCRで増幅した遺伝子断片を制限酵素XbaIとBamHIとで切断した後、3.0%アガロース電気泳動に供し、 $\alpha$ アミラーゼのプロモーター領域を含む0.25kbpのXbaI-BamHI断片をアガロースゲルより  
25



回収した。得られた断片の配列を決定したところ、もとの $\alpha$ アミラーゼ遺伝子のプロモーター配列の、3'末端から3番目と2番目の配列が、AAからTCへと変化しており、BamHI切断部位が導入されていた。

他方で、プラスミドpUB110 (SIGMA社製)をXbaI-BamHIで消化後、得られたプロモーター配列 (0.25 kbp XbaI-BamHI断片)を、T4 DNAリガーゼを用いて連結し、発現カセットpUB-PBを得た (図1)。

(実施例2：本発明のプロモーターの取得および発現カセットの作製)

10 配列番号4の代わりに、配列番号5に示す配列のプライマーを用いた以外は、実施例1と同じ操作を行うことにより、配列番号1の下流にSmaI、KpnI、SacI、EcoRIの制限酵素切断部位が導入されたDNA断片 (0.27 kbp XbaI-EcoRI DNA断片)を、XbaIとEcoRIとで切断したプラスミドpUB110に導入し、発現カセットpUB-PBEを得た。この発現カセットpUB-PBE作成の模式図を図2に示す。

(実施例3：MPase発現ベクターの作製)

20 MPaseの遺伝子は、特開平10-262683号の記載に基づき、バチルス・スピーシーズRK-1株 (FERM P-15044)の染色体から取得した。すなわち、配列表の配列番号6及び配列番号7に示す2種類のプライマーを用いて、PCR法により遺伝子を増幅し、制限酵素BamHI-EcoRIで切断し、0.8%アガロース電気泳動で2.4 kbp BamHI-EcoRI断片を回収した。この断片には、MPaseの構造遺伝子が含まれていた。

25 他方で、プラスミドpUB-PBをBamHI-EcoRIで消化後、M

P a s e 構造遺伝子を含む 2.4 k b p 断片を、T 4 D N A リガーゼを用いて連結し、プラスミド p U B - P B - M P を得た。M P a s e 発現ベクターの構築を図 3 に示す。

さらに、プライマーとして配列表の配列番号 1 3 および 7 に示す配列を用いて、上記操作と同様にして P C R を行った。増幅された D N A 断片を E c o R I で切断し、M P a s e 構造遺伝子を含む 2.4 k b p E c o R I - E c o R I 断片を得た。得られた 2.4 k b p の E c o R I 断片と E c o R I で消化したプラスミド p U B - P B E とを T 4 D N A リガーゼを用いて連結し、プラスミド p U B - P B E - M P を得た。M P a s e 発現ベクターの構築を図 4 に示す。

#### (実施例 4 : T P a s e 発現ベクターの作製)

T P a s e の遺伝子は、特開平 1 0 - 3 2 7 8 8 7 号の記載に基づき、バチルス・ステアロサーモフィラス S K - 1 株 ( F E R M P - 1 4 5 6 7 ) の染色体から取得した。すなわち、配列表の配列番号 8 及び配列番号 9 に示す 2 種類のプライマーを用いて、P C R 法により遺伝子を増幅し、制限酵素 B a m H I - E c o R I で切断し、0.8 % アガロース電気泳動で 2.4 k b p B a m H I - E c o R I 断片を回収した。この断片には、T P a s e の構造遺伝子が含まれていた。

20

他方で、プラスミド p U B - P B を B a m H I - E c o R I で消化後、T P a s e 構造遺伝子を含む 2.4 k b p 断片を、T 4 D N A リガーゼを用いて連結し、プラスミド p U B - P B - T P を得た。T P a s e 発現ベクターの構築を図 5 に示す。

また、プライマーとして配列表の配列番号 1 4 および 9 に示す配列を用いて、上記操作と同様にして P C R を行った。増幅された D N A 断片を E c o

RIで切断し、TPase構造遺伝子を含む2.4kbp EcoRI-EcoRI断片を得た。得られた2.4KbpのEcoRI断片とEcoRIで消化したプラスミドpUB-PBEとをT4DNAリガーゼを用いて連結し、プラスミドpUB-PBE-TPを得た。TPase発現ベクターの構築を図6に示す。

(比較例1：野生型の $\alpha$ アミラーゼプロモーターを有するMPase発現ベクターの作製)

実施例1で得られたバチルス・アミロリクファシエンス IFO 15535の染色体DNAを用い、配列番号3及び配列番号10に示す2種類のプライマーを用いて、PCR法により増幅した。得られた断片を、T4ポリヌクレオチドキナーゼを用いてリン酸化した後、S1ヌクレアーゼを利用して平滑末端化した。その後、XbaIで消化し、3.0%アガロース電気泳動に供し、DNA断片を回収した。この操作によって、5'末端にXbaI切断部位を有し、3'末端が平滑化された0.25kbpの野生型の $\alpha$ アミラーゼプロモーター断片が得られた。

また、バチルス・スピーシーズRK-1株(FERM P-15044)の染色体から、配列表の配列番号11及び配列番号7に示す2種類のプライマーを用いて、PCR法により遺伝子を増幅した。得られた断片を、T4ポリヌクレオチドキナーゼを用いてリン酸化した後、S1ヌクレアーゼを利用して平滑末端化した。その後、EcoRIで切断し、0.8%アガロース電気泳動に供し、DNA断片を回収した。この操作によって5'末端が平滑で、3'末端にEcoRI切断部位を有する2.4kbpのMPase遺伝子を得た。

他方で、プラスミドpUB110を制限酵素XbaI-EcoRIで消化後、先に得たプロモーターの0.25kbp DNA断片およびMPaseの、

2.4 k b p の断片をライゲーションさせた。その結果、発現ベクター p U B - P - M P が得られた。発現ベクター p U B - P - M P の構築の模式図を図 7 に示した。

5 (比較例 2 : 野生型の  $\alpha$  アミラーゼプロモーターを有する T P a s e 発現ベクターの作製)

実施例 3 のバチルス・ステアロサーモフィラス SK-1 株 (FERM P-14567) の染色体から、配列表の配列番号 12 及び配列番号 9 に示す 2 種類のプライマーを用いて、PCR 法により遺伝子を増幅した。得られた断片を、T4 ポリヌクレオチドキナーゼを用いてリン酸化した後、S1 ヌクレアーゼを利用して平滑末端化した。その後、E c o R I で切断し、0.8 % アガロース電気泳動に供し、T P a s e 構造遺伝子領域を含む 2.4 k b p 断片を回収した。この操作によって 5' 末端が平滑で、3' 末端に E c o R I 切断部位を有する T P a s e 遺伝子を得た。

15 他方で、プラスミド p U B 110 を制限酵素 X b a I - E c o R I で消化後、比較例 1 と同様にして、T P a s e の発現ベクター p U B - P - T P を得た。発現ベクター p U B - P - T P の構築の模式図を図 8 に示した。

(実施例 5 : M P a s e 及び T P a s e 活性の比較)

20 (枯草菌への形質転換と発現)

実施例 3 及び 4 並びに比較例 1 及び 2 で得られた発現ベクターを用いて、常法により、バチルス・サチルス 168 株を形質転換して、以下の組換え枯草菌 B. subtilis/pUB-PB-MP、B. subtilis/pUB-PBE-MP、B. subtilis/pUB-PB-T P、B. subtilis/pUB-PBE-T P、B. subtilis/pUB-P-MP、及び B. subtilis/pUB-P-T P を得た。前 4 者は制限酵素部位がプロモーターに導入された発現ベクターを有し、後 2 者は、天然型のプロモーターを有する発現ベクターを有する。

得られた組換え枯草菌株を、100mlのL培地（1%トリプトン、0.5%酵母エキスを、0.5%NaCl、pH7.2、10 $\mu$ gカナマイシン）に植菌し、37℃で一晩培養した。培養液1mlを採取し、遠心分離による集菌と、0.85%NaCl水溶液への懸濁を繰り返し、洗菌した。次に、0.85%NaCl水溶液に懸濁した菌を100mlの2×YT培地（1.6%トリプトン、1.0%酵母エキスを、0.5%NaCl、pH7.2、100 $\mu$ Mカナマイシン）を有する500ml容のひだ付き三角フラスコに植菌し、ロータリーシェーカーを用いて20時間培養した。培養終了後、培養液を超音波処理して菌体を破壊し、遠心分離にて菌体残渣を除去して粗酵素液を調製し、そのMPaseまたはTPaseの活性を測定した。結果を表1に示す。

表 1

	MPase遺伝子 組換え微生物	プロモーターの 制限酵素部位	MPase活性 Units/l	増加率 (倍)
実施例	B.subtilis/pUB-PB-MP	BamHI	240,000	4.8
実施例	B.subtilis/pUB-PBE-MP	B,Sm,K,Sa,E (*1)	240,000	4.8
比較例	B.subtilis/pUB-P-MP	-	50,000	1
	TPase遺伝子 組換え微生物	プロモーターの 制限酵素部位	TPase活性 Units/l	増加率 (倍)
実施例	B.subtilis/pUB-PB-TP	BamHI	300,000	4.3
実施例	B.subtilis/pUB-PBE-TP	B,Sm,K,Sa,E (*1)	300,000	4.3
比較例	B.subtilis/pUB-P-TP	-	70,000	1

(\*1) B:BamHI,Sm:SmaI,K:KpnI,Sa:SacI,E:EcoRI

MPase、及びTPaseとも、3'末端に制限酵素切断部位を有する $\alpha$ アミラーゼプロモーターを用いることによって、生産性を向上することができた。なお、MPase及びTPaseの活性測定は、以下の方法によった。

## (M P a s e の活性測定)

粗酵素液 0.4 ml、0.5 M リン酸クエン酸緩衝液 (pH 6.0) 0.06 ml、2 W/V% マルトース 0.6 ml、及び蒸留水 0.14 ml を混合し、60°C、15 分間 マルトース 分解反応を行った。反応後 10 分間の煮沸によって反応を停止させ、この反応停止液から 0.02 ml を採取し、グルコース検査試薬グルコース CII-テストワコー (和光純薬工業 (株)) を 3 ml 加え、室温で 20 分間反応させた後、505 nm での吸光度を分光光度計を用いて測定し、反応液中のグルコース量を定量した。生成したグルコースの量から 1 分間に 1  $\mu$ mol のトレハロースを加リン酸分解した酵素量を 1 単位とした。

## (T P a s e の活性測定)

基質を 2 W/V% トレハロースとした以外は、M P a s e と同様にして、反応液中のグルコース量を定量し、1 分間に 1  $\mu$ mol のトレハロースを加リン酸分解した酵素量を 1 単位とした。

## (実施例 6 : マンノースイソメラーゼ (M I a s e) 遺伝子の取得と発現カセットの作製)

本発明に用いた M I a s e は、広島県の土壌から単離された、アグロバクテリウム・ラディオバクター (Agrobacterium radiobactor) M36 (FERM P-17377) と同定された菌株から生産される酵素である。この M I a s e 遺伝子は、染色体 DNA を調製し、ショットガンクローニングで M I a s e 生産株を検出することにより、単離され、同定された。

## (染色体 DNA の調製)

L B 液体培地 (ポリペプトン 1%、酵母エキス 0.5%、塩化ナトリウム

0.5% (pH 7.0) 5 ml にアグロバクテリウム・ラディオバクター M36 株 (FERM P-17377) を植菌し、30℃、16 時間振盪培養した。これを、100 ml の LB 培地を含む 500 ml のバッフル付きフラスコに移し、30℃、24 時間培養し、遠心分離により菌体を回収した。

- 5      回収した菌体を 0.1 M の EDTA を含む 0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) に懸濁した。この懸濁液にリゾチーム (和光純薬 (株)) を 4 mg/ml となるように加え、37℃、30 分間、穏やかに振盪した後、-80℃ で 30 分間凍結乾燥した。解凍後、1% SDS と 10 mM の EDTA を含む 0.1 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 9.0) を加え、さらにプロテ
- 10      アーゼ K (宝酒造 (株)) を 0.5 mg/ml となるように加えて、37℃ で 6 時間保温した。この処理液に 1 mM の EDTA を含む 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) (以下、TE 緩衝液という) で飽和したフェノール溶液を加えて除蛋白処理を行い、上清を得た。上清に冷エタノールを加えて生成した染色体 DNA の沈殿を回収し、これを 70% エタノールに 5 分間
- 15      浸した後、TE 緩衝液に溶解した。この溶解液に RNase A (シグマ (株)) を 10 µg/ml となるように加え、37℃、2 時間反応させた。反応液にフェノールを加えて再度、除蛋白処理を行い、冷エタノールを加えて生成した染色体 DNA の沈殿を回収した。得られた精製染色体 DNA を 70% エタノールに 5 分間浸した後、2 mg/ml となるように TE 緩衝液に
- 20      溶解し、染色体 DNA 溶液とした。

(ショットガンスクリーニング: MIsse を発現する形質転換体の選択)

- 染色体 DNA 溶液の 1 ml をとり、これに制限酵素 Sau3AI を約 40 単位加えて 37℃、1 時間反応させて染色体 DNA の部分加水分解物を得、
- 25      アガロースゲル電気泳動法により、約 5~10 kbp の DNA 断片を回収した。

別途、プラスミドベクター pBluescript II SK (+) を制限酵素 BamHI で切断し、その 0.1  $\mu$ g と回収した DNA 断片 1  $\mu$ g を DNA Ligation Kit (宝酒造 (株)) で連結し、組換えプラスミドを得た。これをコンピテントセル (Competent high

5 E. coli JM109 (東洋紡績 (株)) 100  $\mu$ l に加え、氷冷下で 30 分間静置した後、42  $^{\circ}$ C に加温し、SOC 培地 (2% バクトトリプトン、0.5% バクトイーストエキス、10 mM NaCl、2.5 mM KCl、10 mM  $MgCl_2$ 、20 mM グルコース、pH 7.5) を加えて 37  $^{\circ}$ C、1 時間、インキュベートし、組換えプラスミドを大腸菌に導入した。

10 アンピシリン 100  $\mu$ g/ml を含有する LB 培地で形質転換株を選択した。形質転換株を、50  $\mu$ g/ml の 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-ガラクトシドおよび 250  $\mu$ g/ml の イソプロピル 1-チオ- $\beta$ -D-ガラクトシドを含む LB 寒天培地 (pH 7.0) で 37  $^{\circ}$ C、18 時間培養し、白色コロニーを選択した。得られた白色コロニーを、0.

15 3% フラクトースと 2.5 mg/ml リゾチームを含む グルコース CII テストワコー (和光純薬 (株)) に懸濁して、37  $^{\circ}$ C で一晩静置し、目視で顕著な赤色の発色があったコロニーを選別した。

得られた形質転換株が MIIase を発現しているか否かを以下のようにして確認した。イソプロピル 1-チオ- $\beta$ -D-ガラクトシドを 250  $\mu$ g/ml、アンピシリンを 100  $\mu$ g/ml 含有する LB 培地に形質転換株を植

20 菌し、37  $^{\circ}$ C で 24 時間培養した。培養終了後、遠心分離により菌体を回収し、25 ml の 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で 2 回洗浄した。10 ml の同じリン酸緩衝液に菌体を懸濁して超音波破碎を行い、遠心分離して上清を得、これを粗酵素液とした。この粗酵素液と 20% フラクトース溶

25 液とを、50  $^{\circ}$ C で 24 時間反応させ、HPLC でマンノースの生成を確認した。HPLC の条件は以下の通りである。



ポンプ機種：日本分光（株）製 PU-1580

カラム：資生堂（株）製 CAPCELL PAK NH2 UG80

検出器：昭和電工（株）製 RI-71型示差屈折計

溶離液：アセトニトリル：水＝80：20

5 流速：1.0 ml/min

上記条件でマンノースの保持時間は7.6分であり、フラクトースの保持時間は6.7分である。反応液には、7.6分の保持時間の所にピークが見られ、フラクトースからマンノースを生成すること、すなわちMIase活性を有していることが確認された。

10

（推定MIase遺伝子の取得と配列決定）

得られた形質転換体からDNAを取り出し、常法により塩基配列を決定した。得られた約7.0 kbpの配列データを解析し、蛋白質をコードする配列を含有する約1.5 kbpの断片を取得した。この約1.5 kbp断片の

15 DNA配列は、配列番号15に示されている。この配列番号15の第314～316番目のatgが開始コドン、そして、第1559～1561番目のtaaが終止コドンと考えられる。

（本発明のプロモーターの取得及び発現カセットの作製）

3'末端側にNdeIおよびXhoI制限酵素切断部位を有するプロモーター配列とα-アミラーゼのターミネーター配列を有する発現カセットを作

20 成した。

配列番号4の代わりに、配列番号16に示す配列のプライマーを用いた以外は、実施例1と同じ操作を行うことにより、配列番号1の下流にNdeI、XhoIの制限酵素切断部位が導入されたDNA断片（0.25 kbp X

25 baI-XhoI DNA断片）（プロモーター配列）を得た。

他方、Gene、15、43-（1981）に記載のαアミラーゼターミネーター配列を

もとに、配列表の配列番号17および配列番号18の配列を有する2種類のプライマーを合成し、PCR法により増幅した。PCRで増幅した遺伝子断片を制限酵素XhoIとEcoRIとで切断した後、3.0%アガロース電気泳動に供し、 $\alpha$ アミラーゼのターミネーター領域を含む0.28kbpのXhoI-EcoRI断片をアガロースゲルより回収した。この断片の配列を配列番号19に示す。

また、プラスミドpUB110 (SIGMA社製) をXbaI-EcoRIで消化後、得られたプロモーター配列(0.25kbp XbaI-XhoI断片) およびターミネーター配列(0.28kbp XhoI-EcoRI断片) を、T4DNAリガーゼを用いて連結し、発現カセットpUB-PBNを得た(図9)。

#### (MIase発現ベクターの作製)

MIase遺伝子は、配列表の配列番号20及び配列番号21に示す2種類のプライマーを用いて、PCR法により遺伝子を増幅し、制限酵素NdeI-XhoIで切断し、0.8%アガロース電気泳動で1.2kbp NdeI-XhoI断片を回収した。この断片には、配列番号15の341~1558番目からなるMIase構造遺伝子が含まれていた。

前記得られたプラスミドpUB-PBNをNdeI-XhoIで消化後、このMIase構造遺伝子を含む1.2kbp断片を、T4DNAリガーゼを用いて連結し、プラスミドpUB-PBN-MIを得た。MIase発現ベクターの構築を図10に示す。

#### (比較例3)

他方で、比較として、野生型のバチルス・アミロリクファシエンスの $\alpha$ アミラーゼプロモーターを有するMIase発現ベクターを作成した。

アグロバクテリウム・ラディオバクターM36株(FERM P-17377)の染色体から、配列表の配列番号22及び配列番号21に示す2種類のプライマーを用いて、PCR法により遺伝子を増幅した。得られた断片を、T4ポリヌクレオチドキナーゼを用いてリン酸化した後、S1ヌクレアーゼ  
5 を利用して平滑末端化した。その後、XhoIで切断し、0.8%アガロース電気泳動に供し、DNA断片を回収した。この操作によって5'末端が平滑で、3'末端にXhoI切断部位を有する1.2kbpのMiaase遺伝子を得た。

他方で、上記作成したプラスミドpUB-PBNをXbaI-XhoIで  
10 消化後、0.8%アガロース電気泳動に供し、 $\alpha$ アミラーゼプロモーターを含まないDNA断片を回収した。比較例1で得た野生型 $\alpha$ アミラーゼプロモーターの0.25kbp DNA断片およびMiaase遺伝子の、1.2kbpの断片を上記pUB-PBNのDNA断片にライゲーションさせた。その結果、発現ベクターpUB-P-MIが得られた。発現ベクターpUB-P-  
15 MIの構築の模式図を図11に示した。

#### (実施例7)

##### (Miaase活性の比較)

##### (枯草菌への形質転換と発現)

20 実施例6および比較例3で得られた発現ベクターを用いて、常法により、バチルス・サチルス168株を形質転換して、以下の組換え枯草菌*B. subtilis* /pUB-PBN-MI、*B. subtilis*/pUB-P-MIを得た。前者は制限酵素部位がプロモーターに導入された発現ベクターを有し、後者は、天然型のプロモーターを有する発現ベクターを有する。

25 得られた組換え枯草菌株を用いて、実施例5と同様に粗酵素液を調製し、そのMiaaseの活性を測定した。結果を表2に示す。

表 2

	Mlase遺伝子 組換え微生物	プロモーターの 制限酵素部位	Mlase活性 Units/l	増加率 (倍)
実施例	B.subtilis/pUB-PBN-MI	BamHI,NdeI	730,000	6.9
比較例	B.subtilis/pUB-P-MI	-	106,000	1

5

この結果、M I a s e は、天然型に比べて約 7 倍の活性を有しており、M P a s e および T P a s e と同様に 3' 末端に制限酵素切断部位を有する  $\alpha$  アミラーゼプロモーターを用いることによって、生産性を向上することができた。

10      なお、M I a s e の活性測定は、以下の方法によった。

100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解した 200 mM のマンノース溶液 200  $\mu$  l に適宜希釈した酵素溶液 200  $\mu$  l を加え、50℃で酵素反応を行なった。次いで、酵素反応を 10 分間の煮沸によって停止させ、HPLC によって糖組成の分析を行なった。この条件下で、1 分間に 1  $\mu$  mol

15      のフラクトースを生成する酵素量を 1 単位とした。

#### 産業上の利用可能性

$\alpha$  アミラーゼプロモーターの 3' 末端に制限酵素切断部位を導入することによって、プロモーター活性が向上することがわかった。このプロモーターは活性が高い上、制限酵素切断部位を有するので外来遺伝子を組込みやすく、

20      物質生産に有用である。

## 請求の範囲

1. バチルス属に属する微生物に由来する $\alpha$ -アミラーゼのプロモーターであって、該プロモーター配列の3'末端近傍とタンパク質の開始コドンとの間に1または2以上の制限酵素切断部位配列を有する配列が導入され、かつ、  
5 該プロモーターの活性が天然のプロモーターの活性よりも高い、プロモーター。
2. 前記 $\alpha$ -アミラーゼのプロモーターが、バチルス・アミロリクファシエ  
10 ンスに由来する、請求項1に記載のプロモーター。
3. 前記制限酵素切断部位がB a m H Iである、請求項1または2に記載のプロモーター。
- 15 4. 前記プロモーターが配列番号1に記載の配列を有する、請求項3に記載のプロモーター。
5. 前記制限酵素切断部位配列が、B a m H IとB a m H I以外の1又は2以上の制限酵素切断部位を含む配列であり、該B a m H I以外の制限酵素切  
20 断部位が該B a m H I切断部位よりも下流に存在する、請求項1または2に記載のプロモーター。
6. 前記制限酵素切断部位配列が、B a m H IとE c o R Iとの制限酵素切断部位配列を有し、該B a m H IとE c o R I切断部位との間に1又は2以  
25 上の制限酵素切断部位配列を有してもよい、請求項5に記載のプロモーター。

7. 前記プロモーターの配列が配列番号 2 の配列であり、前記制限酵素切断部位が 5' 末端側から順に、B a m H I、S m a I、K p n I、S a c I および E c o R I の制限酵素切断部位である、請求項 6 に記載のプロモーター。

5      8. 前記制限酵素切断部位配列が、5' 末端側から B a m H I、N d e I、および X h o I の順で制限酵素切断部位配列を有する、請求項 5 に記載のプロモーター。

10      9. 請求項 1 ないし 8 のいずれかの項に記載のプロモーターを有する発現カセット。

10. 請求項 9 の発現カセットの制限酵素切断部位にタンパク質をコードする遺伝子が組み込まれた発現ベクター。

15      11. 前記タンパク質をコードする配列が菌体内酵素の配列である、請求項 10 に記載の発現ベクター。

12. 前記タンパク質をコードする配列がホスホリラーゼまたはイソメラーゼの配列である、請求項 10 に記載の発現ベクター。

20

13. 前記ホスホリラーゼがトレハロースホスホリラーゼ、またはマルトースホスホリラーゼである、請求項 12 に記載の発現ベクター。

25      14. 前記イソメラーゼがマンノースイソメラーゼである、請求項 12 に記載の発現ベクター。

15. 請求項10ないし14のいずれかの項に記載の発現ベクターを有する組換え微生物。

5 16. 請求項15に記載の組換え微生物を培養する工程を含む、タンパク質の製造方法。

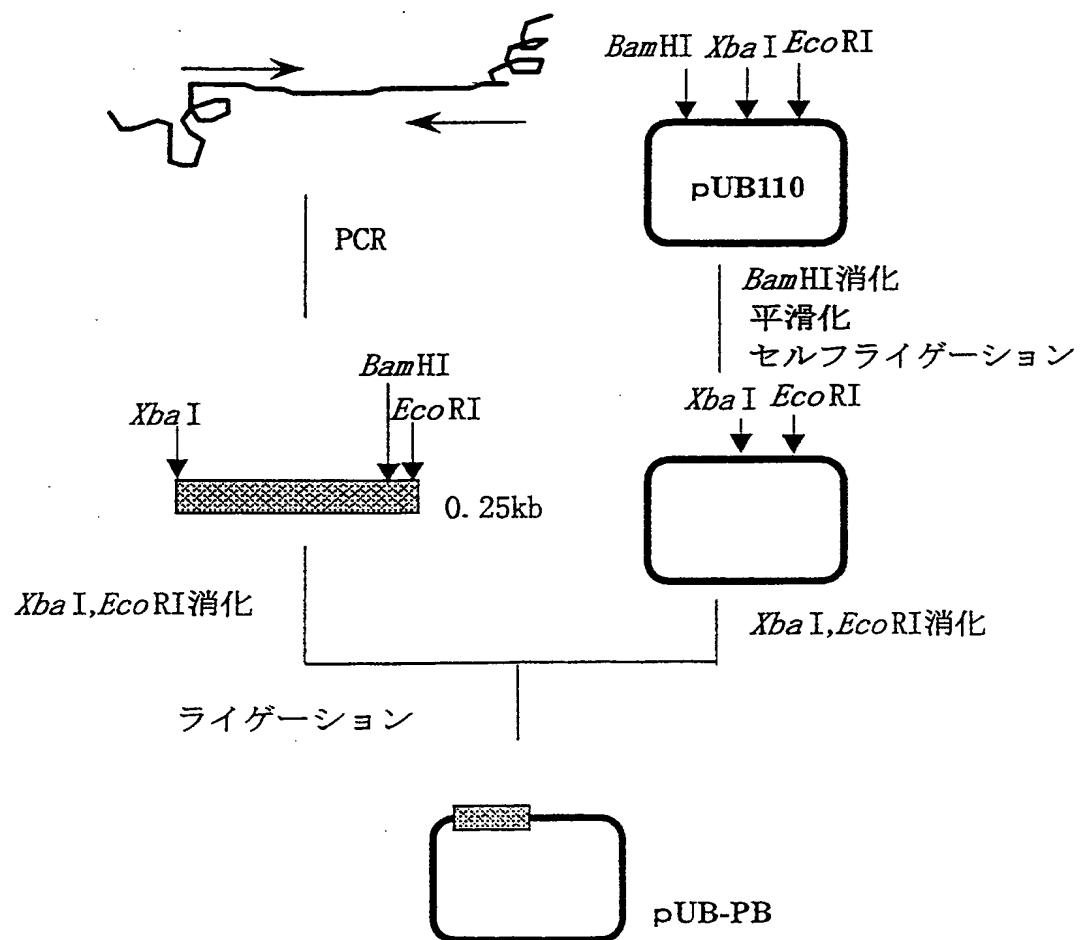




1 / 11

第1図

## バチルス・アミロリクファシエンス染色体

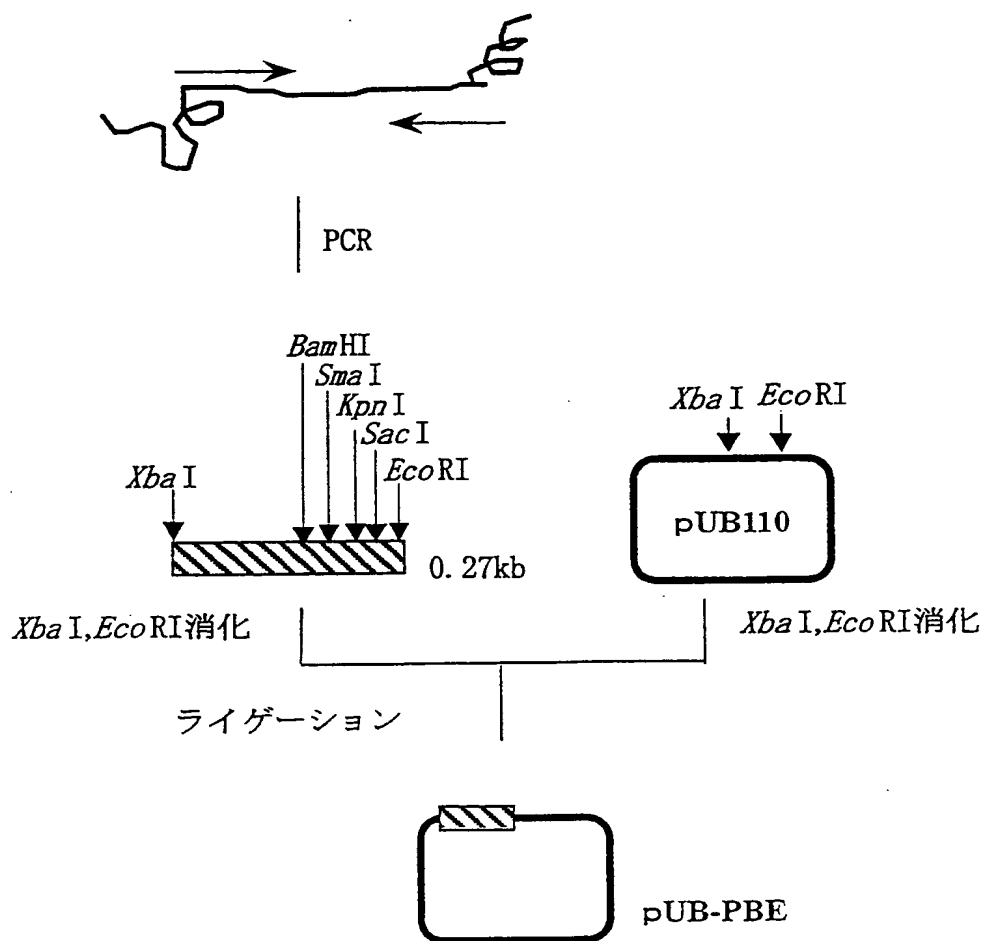




2 / 11

## 第2図

バチルス・アミロリクファシエンス染色体

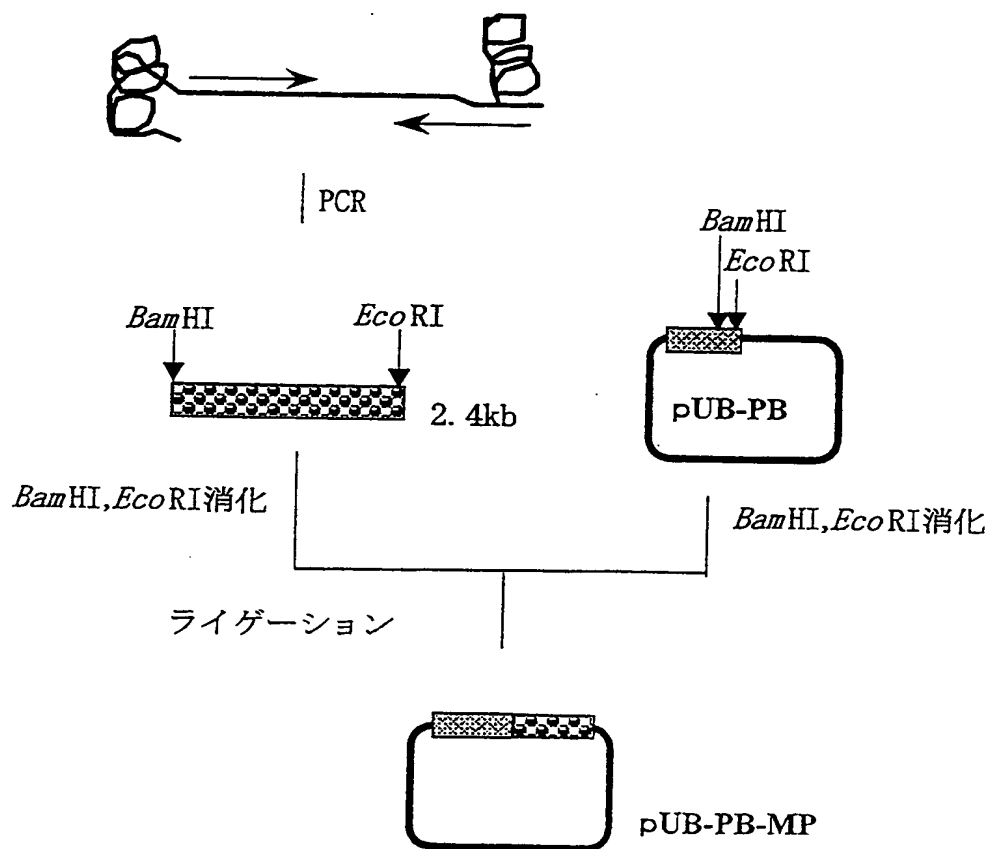




3 / 11

第3図

バチルス・スピーシーズ RK1株染色体

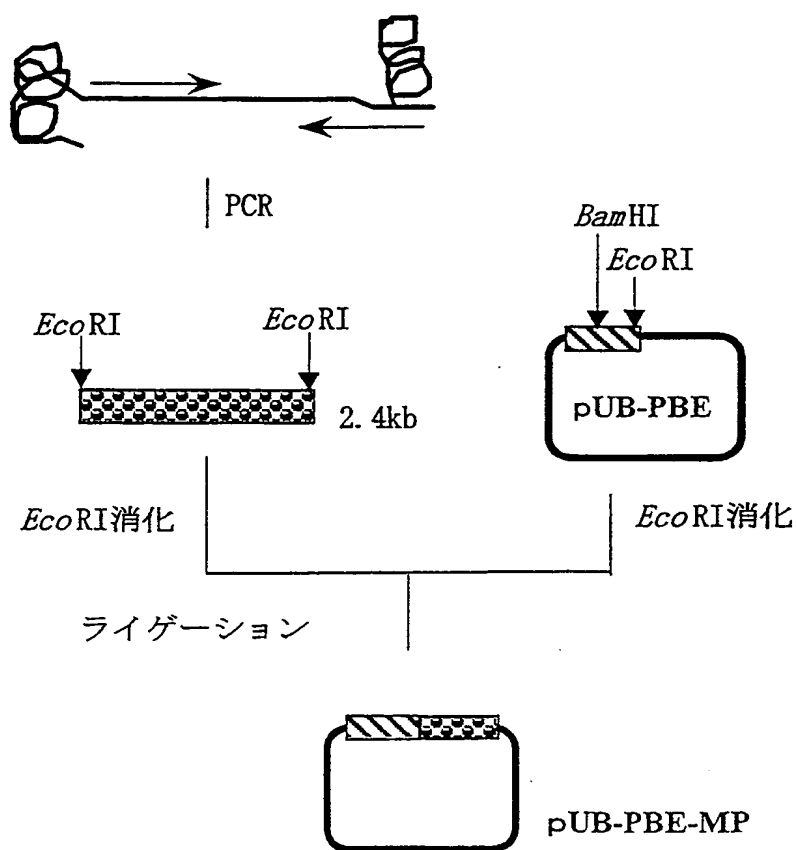




4 / 11

第4図

バチルス・スピーシーズ RK1株染色体



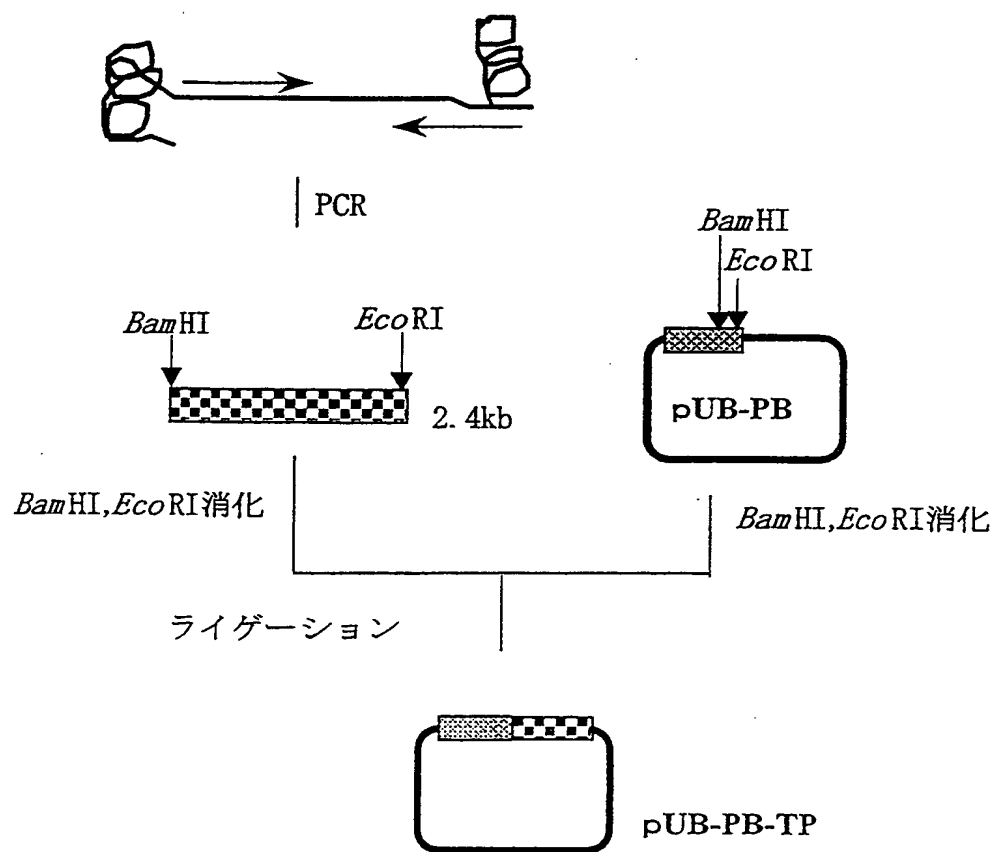




5 / 11

第5図

バチルス・スピーシーズ SK1株染色体

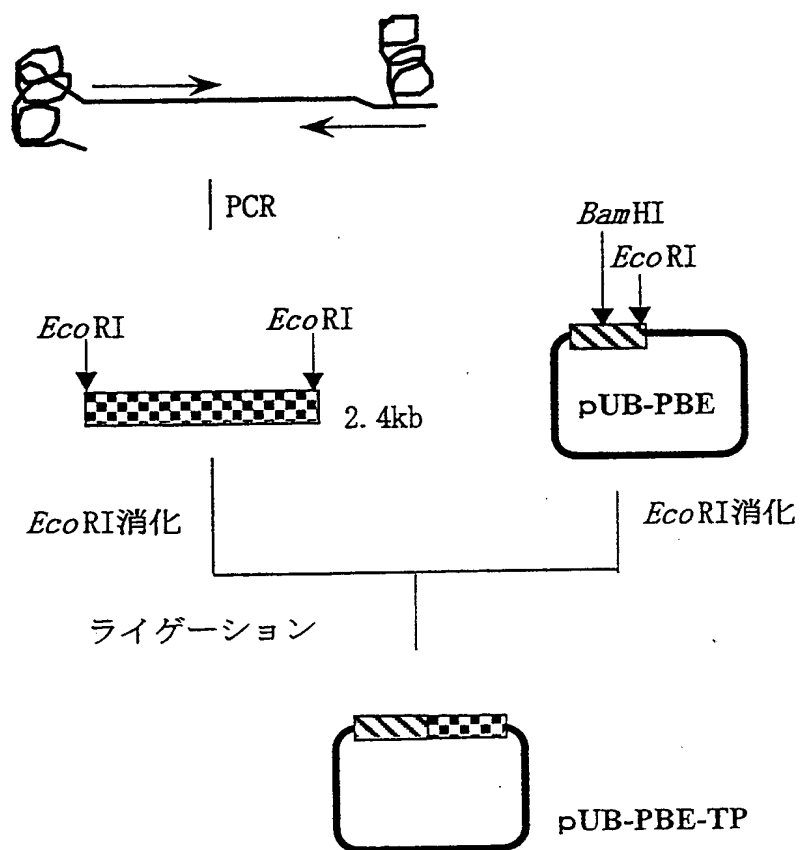




6 / 11

第6図

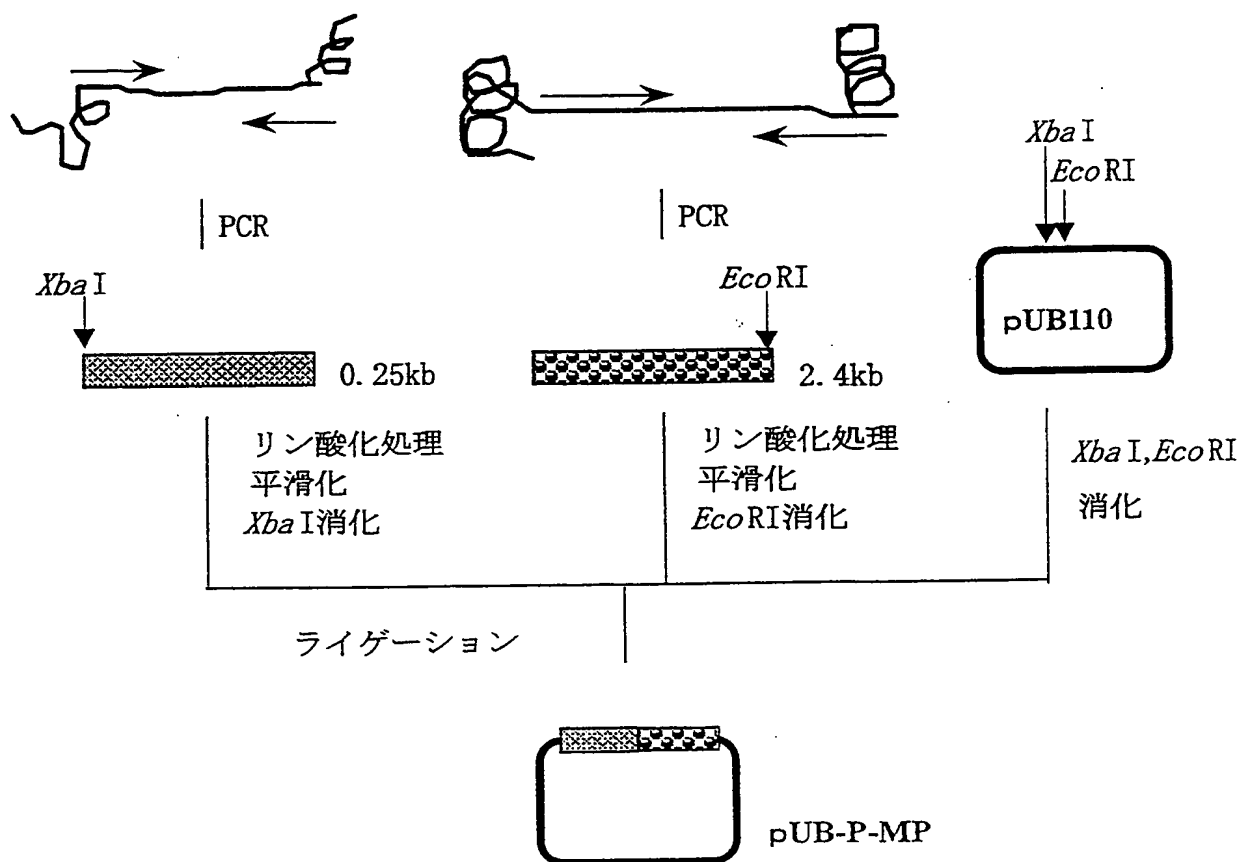
バチルス・スピーシーズ SK1株染色体





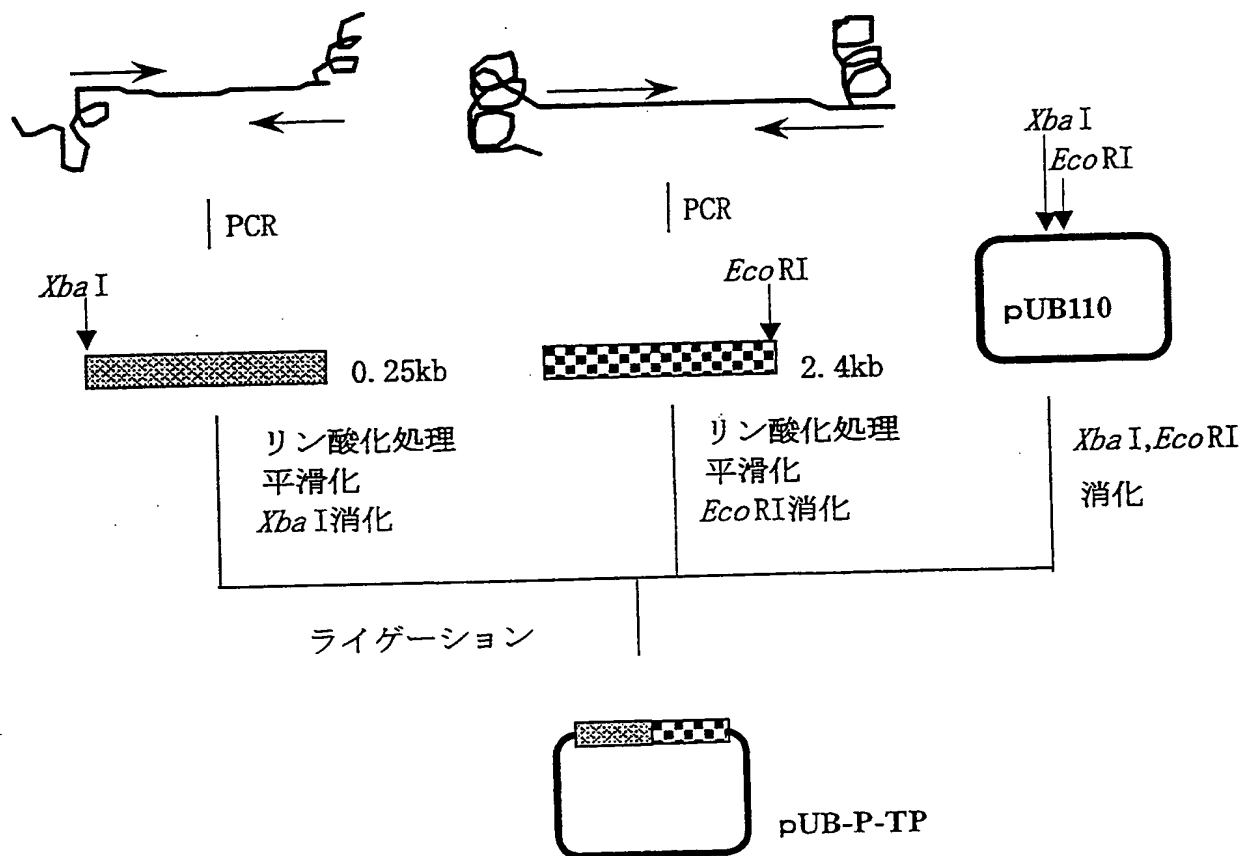
7 / 11

第7図

バチルス・アミロリクファシ  
エンス染色体バチルス・スピーシーズ  
RK1株染色体



第8図

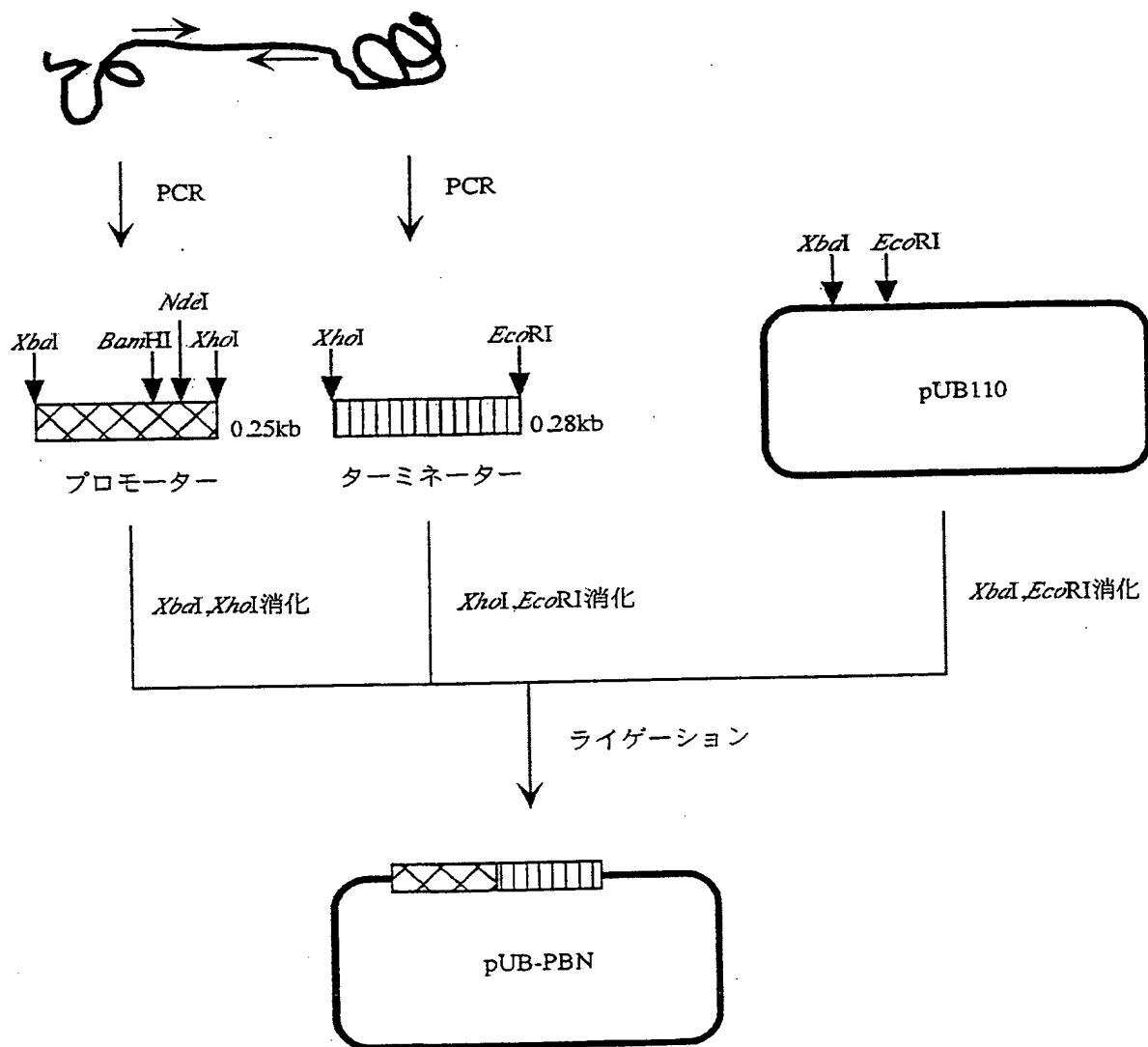
バチルス・アミロリクファシ  
エンス染色体バチルス・スピーシーズ  
SK1株染色体





第9図

バチルス・アミロリクファシエンス染色体

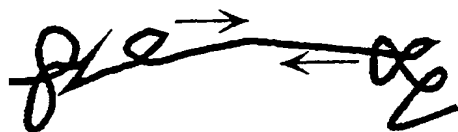
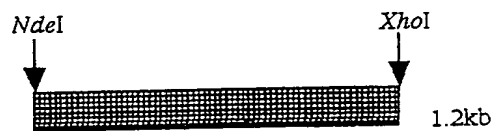




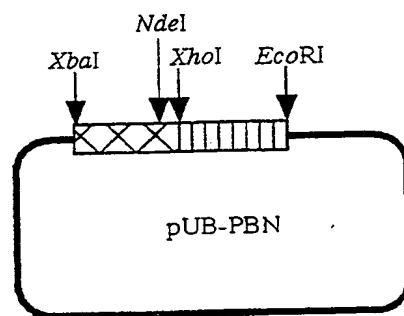
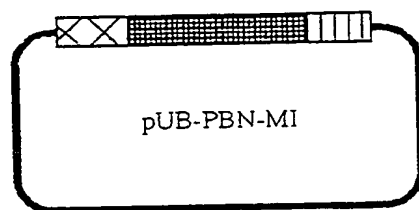
10/11

## 第10図

アグロバクテリウム・ラディオバクター染色体

PCR  
↓

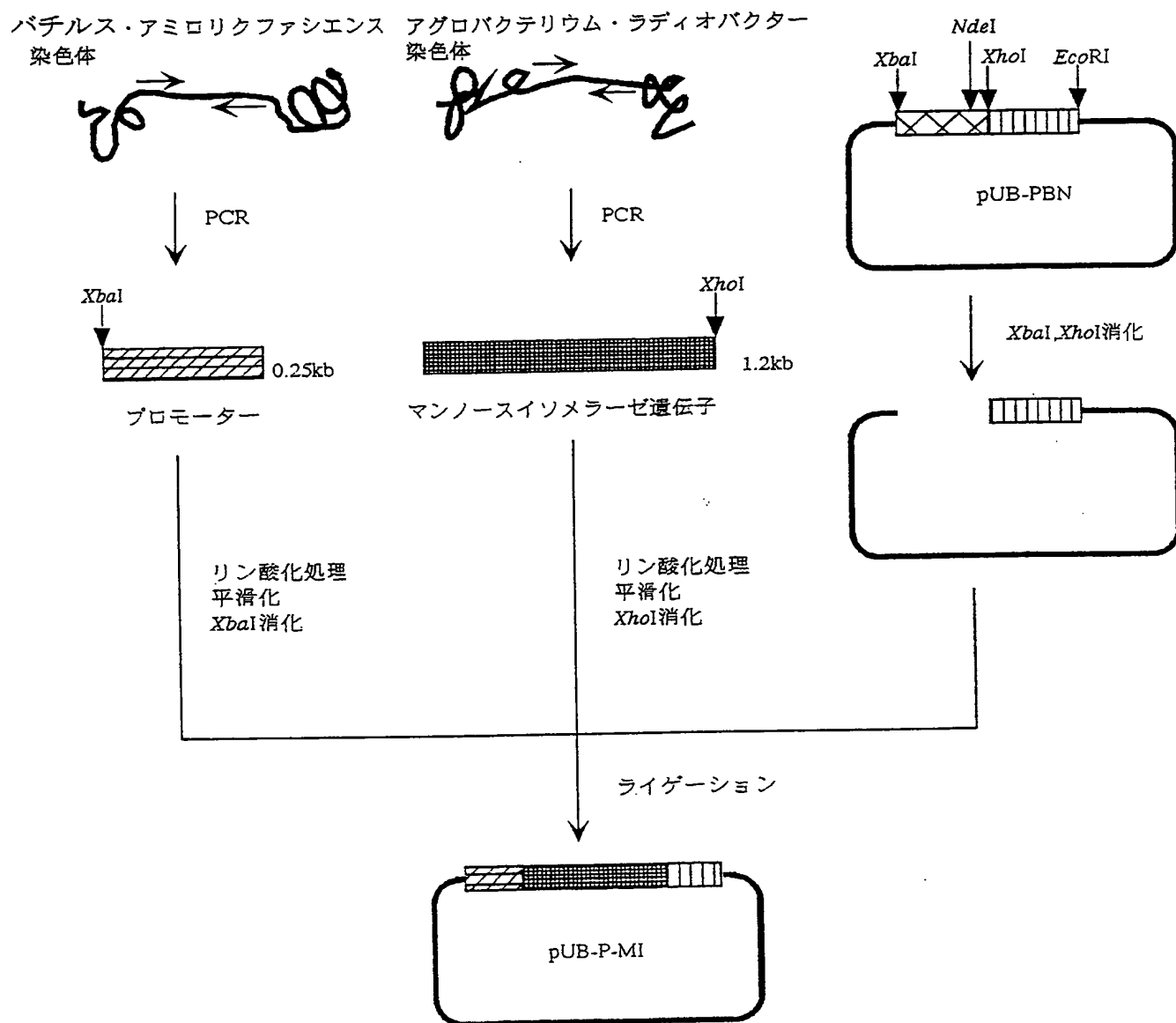
マンノースイソメラーゼ遺伝子

*NdeI*, *XhoI* 消化*NdeI*, *XhoI* 消化ライゲーション  
↓



11 / 11

第11図





1 / 7

## 配列表

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Showa Sangyo Co., Ltd.

&lt;120&gt; Promoter

&lt;130&gt; P2-00S01014

&lt;160&gt; 12

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 249

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Bacillus amyloliquefaciens

&lt;400&gt; 1

```

gccccgcaca tacgaaaaga ctggctgaaa acattgagcc tttgatgact gatgatttgg 60
ctgaagaagt ggatcgattg tttgagaaaa gaagaagacc ataaaaatac cttgtctgtc 120
atcagacagg gtatttttta tgctgtccag actgtccgct gtgtaaaaaa taggaataaa 180
gggggggttg tattatttta ctgatatgta aaatataatt tgtataagaa aatgagaggg 240
agaggatcc 249

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 270

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Bacillus amyloliquefaciens

&lt;400&gt; 2

```

gccccgcaca tacgaaaaga ctggctgaaa acattgagcc tttgatgact gatgatttgg 60
ctgaagaagt ggatcgattg tttgagaaaa gaagaagacc ataaaaatac cttgtctgtc 120
atcagacagg gtatttttta tgctgtccag actgtccgct gtgtaaaaaa taggaataaa 180
gggggggttg tattatttta ctgatatgta aaatataatt tgtataagaa aatgagaggg 240
agaggatcc ccgggtaccga gctcgaattc 270

```

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 29





2 / 7

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial

&lt;400&gt; 3

cgctctagag ccccgcacat acgaaaaga

29

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial

&lt;400&gt; 4

cgcggaattcg gatcctctcc ctctcat tttt cttat

35

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 50

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial

&lt;400&gt; 5

cgcggaattcg agctcggtac ccggggatcc tctccctctc attttcttat

50

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial

&lt;400&gt; 6

cgcggatcca tgtattacaa caggttggtt

29

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 29

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial

&lt;400&gt; 7

cgcggaattct cacacatact ccttcgtat

29



3 / 7

<210> 8  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> artificial  
<400> 8  
cgcggatcca tgtcttggtc aattagctc 29  
<210> 9  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> artificial  
<400> 9  
aaagaattct taatcaacac gcccgttat 29  
<210> 10  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> artificial  
<400> 10  
gtttcctctc cctctcattt tcttat 26  
<210> 11  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> artificial  
<400> 11  
atgtattaca acaggttggt 20  
<210> 12  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> artificial



4 / 7

<400> 12	
atgtcttggt caattagctc	20
<210> 13	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> artificial	
<400> 13	
cgcggaattca tgtattacaa caggttggt	29
<210> 14	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> artificial	
<400> 14	
cgcggaattca tgtcttggtc aattagctc	29
<210> 15	
<211> 1581	
<212> DNA	
<213> Agrobacterium radiobacter M36	
<400> 15	
gatctgcgtg cccatggcac cgtcgagaat gaggatgcgt tcgctggcag cctcgcgcag	60
cgccttgaaa atttccgcgc cgtcgcgctt tgcccccttca gggccaaaca gatcgtcaaa	120
cacgggcaca ctctcattt cgatttgcaa gatcgcaagt cgtcaagtca cataaagata	180
tgtttatgtc aatatatctt caagggacag gcatggcttt gcgtcgttgc gtcacgttac	240
gaaatatcgc tgacagatga caggtttata cggcaaggat ataagccgaa gcagcaaacg	300
catggaggac gcaatgcccg aagacgatca caacagccgc aactggaata ccctgccctg	360
gcaccgccag tggctggtga aacaggccga gggacttttc gacttcttcc agtatcgcgc	420
cctcaatccc gccggcgggtt tcttcgatct cgacgccaag ggcgcgccgc tgcaggcaaa	480
cgatcccggtg cgcggcatcc atgcctctgc gcgcatggtg cattgcttct ccatcggcca	540



5 / 7

cctgctcggc cggccgggct gcggcgatat cgtcgaccac ggcatgacct atctctggaa 600  
 caaacaccgc gatggcgaac atggcggtta tttctggcag gtgaacgatg ccggcccagt 660  
 ggacgccacc aagcagggtt atggccacgc cttcgtgctt ctggccgcct cttccgccaa 720  
 gaccgtcggc caccgcctgg ccgaccggat gctggctgat attaccgaag tgctggaaag 780  
 tcgtttctgg gaagaaaaac atggcgccat cgccgaggaa ttcaatcgcg actggtcgcc 840  
 catcgacaat tatcgcggcc agaactccaa tatgcacctc accgaagcgc tgatggccgc 900  
 ctatgaggtg accggcgaca ataactatct cagcaaggcc gaacgcatcg ccgatctcgt 960  
 catccgtcgc cgcgccggcg agctggattt ccgctgccc gagcatttcg acgacaactg 1020  
 gagctggac aaggactatc gcggcaacga aatgttccgc ccctccggct ccacccccgg 1080  
 ccactggctg gaatgggcgc gtctcactct gcaattgtgg atactgggcg aacgccgcca 1140  
 cgactggatg ccggtcgcgg ccaaaccct cttcgtgcag tccatggcg tggtctggga 1200  
 ccgggaaaag ggcggcttct tttatacgct ggactggaat gacaatcccg acaagcgggc 1260  
 aaagctctgg tggcccatgt ccgaggcggc ggtgctggcc catttcctca acgagaacct 1320  
 gccggcggat ggcttctacg aagacagcta tcgtcgcatc tggagcacca tcgccaacaa 1380  
 cttcatcgac catgccaatg gcggctggca tgaggaactg acggaagatc tggttcccgc 1440  
 ccacacgcta ttcccaggca agggcgatat ctaccatgcg ctccaggcct gcctcatccc 1500  
 gcttttcccg gcgacgggca gcctgacgaa ggtgatcaag gaaagcggcg gggattatta 1560  
 aggcgctctg cggccaatag c 1581

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 39

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial

&lt;400&gt; 16

gcattctgag catatgcgga tcctctccct ctcatcttc

39

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial





6 / 7

&lt;400&gt; 17

gcatctcgag ggtaataaaa aaacacctcc a

31

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial

&lt;400&gt; 18

gcatgaattc aaagcagcga tcccgatgaa

30

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 283

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Bacillus amyloliquefaciens

&lt;400&gt; 19

ctcgagggta ataaaaaac acctccaagc tgagtgcggg tatcagcttg gaggtgcgtt

60

tattttttca gccgtatgac aaggctcgga tcaggtgtga caaatacggg atgctggctg

120

tcataggtga caaatccggg ttttgcgccg tttggctttt tcacatgtct gatTTTTgta

180

taatcaacag gcacggagcc ggaatctttc gccttgaaa aataagcggc gatcgtagct

240

gcttccaata tggattgttc atcgggatcg ctgctttgaa ttc

283

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial

&lt;400&gt; 20

gcatcatatg cccgaagacg atcacaac

28

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial



7 / 7

&lt;400&gt; 21

gcatctcgag ttaataatcc ccgcccgttt c

31

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial

&lt;400&gt; 22

atgcccgaag acgatcacao c

21



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01415

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/75, C12N1/21, C12P21/00, C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/75, C12N1/21, C12P21/00, C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GenBank/EMBL/DDBJ

BIOSIS (DIALOG)

WPI (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LEHTOVAARA, P., et al., "In vivo transcription initiation and termination sites ... from Bacillus amyloliruefaciens ...", Gene (1984) Vol.30, No.1/3, p.11-16	1-16
A	HORINOUCI, S., et al., "Construction and characterization of multicopy expression-vectors ...", Mol.Gen.Genet. (1987) Vol.210, No.3, p.468-475	1-16
A	EP 681027 A2 (ENIRICERCHIE S.P.A.) 8 November 1995 (08.11.95) &JP 7-289271 A, &US 5721137 A, &IT 1274168 B	1-16
A	JP 4-278091 A (HIGETA SHOYU CO., LTD.) 2 October 1992 (02.10.92) (Family: none)	1-16



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 07 June, 2000 (07.06.00)	Date of mailing of the international search report 20.06.00
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/01415

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/75, C12N1/21, C12P21/00, C12P21/02

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/75, C12N1/21, C12P21/00, C12P21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DBJ

BIOSIS(DIALOG)

WPI(DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	LEHTOVAARA, P., et al., "In vivo transcription initiation and termination sites ... from Bacillus amyloiruefaciens ...", Gene (1984) Vol. 30, No. 1/3, p. 11-16	1-16
A	HORINOUCI, S., et al., "Construction and characterization of multicopy expression-vectors ...", Mol. Gen. Genet. (1987) Vol. 210, No. 3, p. 468-475	1-16

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.06.00

国際調査報告の発送日

20.06.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小暮 道明



4B

9358

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/01415

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	EP 681027 A2 (ENIRICERCHE S. P. A.) 8 November 1995 &JP 7-289271 A, &US 5721137 A, &IT 1274168 B	1 - 1 6
A	JP 4-278091 A (ヒゲタ醤油株式会社) 2 October 1992 ファミリーなし	1 - 1 6